



TITLE:

Physicochemical studies on interaction  
between intrinsically disordered regions in  
transcription factors Sp1 and TAF4(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Hibino, Emi

---

CITATION:

Hibino, Emi. Physicochemical studies on interaction between intrinsically disordered regions in transcription factors Sp1 and TAF4. 京都大学, 2017, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20299>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2018-03-22に公開

京都大学	博 士（薬科学）	氏 名	日比野 絵美
論文題目	Physicochemical studies on interaction between intrinsically disordered regions in transcription factors Sp1 and TAF4 (転写因子Sp1とTAF4の天然変性領域を介した相互作用に関する物理化学的研究)		
<p>真核生物の発生や細胞の分化には、様々な遺伝子が適切な時期および部位で発現するように巧妙に制御されることが重要である。遺伝子の転写はSp1をはじめとする転写調節因子と、TFIIDなどの基本転写因子群との相互作用により調節を受けている。TFIIDの構成要素の一つであるTAF4とSp1は互いのグルタミンリッチドメイン（Qドメイン）を介して相互作用することが、分子生物学的な研究により報告されている。Qドメインとはグルタミン残基を25%以上含んでいる領域であり、代表的な転写活性化ドメインであると同時に転写因子同士の相互作用に関与すると言われている。Sp1は2つ（Sp1-QA, -QB）、TAF4は4つ（TAF4-Q1, -Q2, -Q3, -Q4）のQドメインを有している。しかしながらSp1とTAF4のQドメインを介した相互作用に関する生物物理学的な研究はなされておらず、その分子機構は未解明のままである。本研究は、転写調節に重要とされるQドメインの構造学的特徴ならびにその相互作用について詳細な知見を得ることを目的とし、種々の物理化学的手法による解析を行った。</p> <p>第1章では、Sp1とTAF4のQドメインの構造について調べた。NMR、X線小角散乱（SAXS）およびCDスペクトルによって Sp1-QA, Sp1-QB および TAF4 の中央領域（4つのQドメイン全てを含む）いずれも明確な二次構造を持たないことが判明した。近年、生理的条件下で特定の二次構造を持たない天然変性タンパク質（intrinsically disordered proteins, IDP）が、転写やシグナル伝達に関与するタンパク質において数多く発見されている。本研究により Sp1 と TAF4 いずれの Q ドメインも IDP の一種であることが分かった。一方で SAXS の結果を詳細に解析した結果、完全なランダムコイル状態ではなく残存構造を有していることが示唆された。</p> <p>第2章では、Sp1とTAF4のQドメインを介した相互作用について NMR による解析を行った。多次元 NMR においてタンパク質の各アミノ酸のアミド基の <math>^1\text{H}</math> および <math>^{15}\text{N}</math> の化学シフトは、リガンドや他のタンパク質との相互作用により引き起こされる各スピンを取り巻く環境の微細な変化を敏感に反映する。一方主鎖および側鎖の <math>^{13}\text{C}</math> の化学シフトは、主にタンパク質の二次構造を反映する。<math>^1\text{H}</math> と <math>^{15}\text{N}</math> の化学シフトを残基レベルで解析した結果、Sp1 の QB ドメインの C 末端側と TAF4 の Q1 ドメインが相互作用することが明らかとなった。一方 <math>^{13}\text{C}</math> の化学シフトを詳細に解析した結果、相互作用前後で二次構造の変化は生じていないことが明らかとなった。本研究により、IDP において主に支持されている coupled folding and binding 機構とは異なる、IDP の新規の相互作用様式を提唱することができた。</p>			

第3章では、Sp1のQドメインのTAF4認識機構について解析した。第2章で同定したSp1のTAF4との相互作用の中心領域からは少し離れた箇所に位置するが、これまでの分子生物学的手法により直接の結合部位と報告されている Trp および Leu に関して、それらの Ala 変異体を用いて NMR による解析を行った。その結果、従来までの報告と同様に、変異体では TAF4 の Q ドメインとは相互作用しないことが明らかとなった。また、変異体、野生型、および複合体形成時の野生型の NMR スペクトルと比較したところ、変異体では結合部位であるアミノ酸を中心に複数のピークが結合時とは逆方向にシフトしていることがわかった。このことから Sp1 の Q ドメイン変異体の TAF4 との結合能が失われた理由として次のような機構が考えられる。すなわち、(1) Sp1 の QB ドメインは結合型、非結合型の2つの構造状態の平衡として存在しており、結合型でのみ TAF4 と結合できる。(2) Trp や Leu への変異の導入は非結合型をより安定化させる、というものである。

本研究によって、転写因子 Sp1 と TAF4 の Q ドメインが IDP であること、ならびにそれらの相互作用領域が明らかとなった。また、IDP が必ずしも相互作用の際に構造変化を伴わないことが示された。さらに IDP においても結合部位とは異なる残基の変異が結合に大きく影響を与える可能性があることが明らかとなった。これらの知見が今後、転写やシグナル伝達に重要な、IDP を介した相互作用の発見に繋がることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、転写調節因子 Sp1 と基本転写因子群 TFIID の構成要素の一つである TAF4 との相互作用を、高分解能 NMR を初めとする物理化学的手法により解明したものである。

Sp1 と TAF4 とはグルタミンリッチドメイン (Q ドメイン) を介して相互作用することが、分子生物学的な研究により報告されている。Sp1 は 2 つ (Sp1-QA, -QB)、TAF4 は 4 つ (TAF4-Q1, -Q2, -Q3, -Q4) の Q ドメインを有している。まず第 1 章では、これら Q ドメインが天然変性タンパク質 (IDP) であるが、完全なランダムコイル状態ではなく残存構造を有していることを明らかにした。

第 2 章では、Sp1 の QB ドメインの C 末端側と TAF4 の Q1 ドメインが相互作用し、相互作用前後で二次構造の変化は生じていないことを明らかにした。この結果は IDP において主に支持されている coupled folding and binding 機構とは異なるものであった。

第 3 章では、これまでの分子生物学的手法により直接の結合部位と報告されている Trp および Leu の Ala 変異体では TAF4 の Q ドメインとは相互作用しないことを明らかにした。その理由として、(1) Sp1 の QB ドメインは結合型、非結合型の 2 つの構造状態の平衡として存在しており、結合型でのみ TAF4 と結合できる。(2) Trp や Leu への変異の導入は非結合型をより安定化させる、というモデルを提唱した。

以上、本論文は、転写調節機構の一端を構造生物学的に解明したものであり、博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。